



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 199 310** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 9/08, 33/14, A 61 P 41/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99102851/14, 16.05.1997  
(24) Дата начала действия патента: 16.05.1997  
(30) Приоритет: 17.05.1996 US 08/649,200  
(43) Дата публикации заявки: 10.12.2000  
(46) Дата публикации: 27.02.2003  
(56) Ссылки: RU 2019965 C1, 30.09.1994. RU 2025973 C1, 09.01.1995. US 5395314, 07.03.1995. US 5137510, 11.08.1992. US 5011469, 07.03.1990.  
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 04.02.1999  
(86) Заявка РСТ: US 97/08205 (16.05.1997)  
(87) Публикация РСТ: WO 97/43899 (27.11.1997)  
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г. Лебедевой

(71) Заявитель: БРЕОНИКС, ИНК. (US)  
(72) Изобретатель: БРЭСАЙЛ Лорен (US)  
(73) Патентообладатель: БРЕОНИКС, ИНК. (US)  
(74) Патентный поверенный: Егорова Галина Борисовна

(54) РАСТВОР И СПОСОБ ДЛЯ ОЖИВЛЕНИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ТКАНИ

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к консервации, сохранению и восстановлению тканей и органов. Способ представляет собой промывание органа при температуре 28 - 37°C содержащим буфер физиологическим раствором для удаления крови и кислотических продуктов и перфузию органа при температуре 28 - 37°C

содержащим буфер физиологическим раствором, который дополнительно содержит средства для расширения сосудов, трофические факторы, средства для восстановления окислительного метаболизма и другие вещества. Предложенный способ позволяет сохранить ткани и органы для трансплантации в течение более длительного времени. 8 с. и 22 з.п. ф-лы, 5 ил., 6 табл.

RU 2 199 310 C2

RU 2 199 310 C2



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 199 310** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 9/08, 33/14, A 61 P**  
**41/00**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99102851/14, 16.05.1997  
(24) Effective date for property rights: 16.05.1997  
(30) Priority: 17.05.1996 US 08/649,200  
(43) Application published: 10.12.2000  
(46) Date of publication: 27.02.2003  
(85) Commencement of national phase: 04.02.1999  
(86) PCT application:  
US 97/08205 (16.05.1997)  
(87) PCT publication:  
WO 97/43899 (27.11.1997)  
(98) Mail address:  
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
Partnery", pat.pov. N.G. Lebedevoj

(71) Applicant:  
BREONIKS, INK. (US)  
(72) Inventor: BREhSAJL Loren (US)  
(73) Proprietor:  
BREONIKS, INK. (US)  
(74) Representative:  
Egorova Galina Borisovna

(54) **SOLUTION AND METHOD FOR REVIVIFICATION AND RESTORATION OF ISCHEMICALLY AFFECTED TISSUE**

(57) Abstract:  
FIELD: medicine. SUBSTANCE: method deals with conservation, preservation and restoration of affected tissues and organs. The method deals with washing an organ at 28-37 °C with buffer-containing physiological solution for removal of blood and acidotic products and organ's perfusion at 28-37 °C with buffer-containing

physiological solution which additionally contains vasodilative preparations, trophic factors, preparations for restoration of oxidizing metabolism and other substances. Said method enables to save tissues and organs for transplantation during more prolonged period of time. EFFECT: higher efficiency. 30 cl, 5 dwg, 13 ex, 6 tbl

RU 2 199 310 C 2

RU 2 199 310 C 2

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к консервации, сохранению и восстановлению тканей и органов. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает способ, благодаря которому, при использовании композиции настоящего изобретения, восстанавливается целостность, функция и жизнеспособность ишемически поврежденного органа или ткани.

Предпосылки к созданию изобретения

Нехватка органов для трансплантации остается чрезвычайно актуальной проблемой. В настоящее время главным лимитирующим фактором в клинической трансплантации остается постоянная нехватка органов. Например, трансплантация почек сильно зависит от доступности органов, взятых от умерших доноров при еще работавшем сердце. Помимо этого, большим и еще не закрытым источником органов для трансплантации остаются трупы с неработающим сердцем. Трупы с неработающим сердцем являются жертвами несчастных случаев, которые умерли непосредственно от самого повреждения, или жили короткое время после травмы. В таких случаях причинами того, что эти органы не используются, является, в силу прекращения деятельности сердца, отсутствие циркуляции крови (теплая ишемия), которое запускает каскад повреждения.

Орган, сильно поврежденный тепловой ишемией, но функционально еще сохраненный, не может перенести дальнейшего повреждения при гипотермии. В условиях гипотермии, которую применяют для консервации органов, предназначенных для трансплантации, липидные двухслойные мембраны меняют фазу и становятся похожими на гель, со значительным уменьшением текучести. Сильно замороженный липид в клеточных мембранах не позволяет утилизировать кислород, даже в присутствии высокого давления  $O_2$ . Метаболическим последствием этого является гликолиз, который аналогичен состоянию гипоксии. Описано, что при температуре ниже  $18^\circ C$  гипотермия ингибирует активность канальцев почек и что при  $4^\circ C$  утилизация кислорода составляет приблизительно 5% от нормы.

Гипотермическое хранение может также вызвать вазоспазм с последующим отеком органа. У сохраняемых в условиях гипотермии органов может появляться набухание гломерулярных эндотелиальных клеток и нарушение целостности сосудов с некрозом канальцев; наблюдается феномен, присущий гипотермическим условиям. Гипотермия может также ингибировать  $Na/K$ -зависимую АТФазу и приводить к утрате способности клеток регулировать объем. Именно утрата регуляции объема вызывает набухание и повреждение клеток. Достаточное снабжение кислородом может активно уменьшать степень этого набухания. Без адекватной доставки кислорода гипоксия приводит к дезинтеграции мелких сосудов после нескольких часов перфузии. Недостаток кислорода и последующее истощение запасов АТФ означает, что анаэробный гликолиз является главным источником энергии при традиционных условиях консервации. Недостаток молекулярного

кислорода для окислительного фосфорилирования, который наблюдается при ишемии, приводит к накоплению НАДФ и истощению запасов АТФ в митохондриях. Последующая потеря нуклеозидов является, по-видимому, очень важным фактором в неспособности тканей, подвергшихся тепловой ишемии и продолжительным периодам холодной ишемии, восстановить АТФ после возобновления кровоснабжения. Из-за неспособности обеспечить адекватное снабжение кислородом остается полагаться на рутинную гипотермию для консервации органов.

Таким образом, ишемия (теплая или холодная) является каскадом повреждения и ее можно охарактеризовать как прелетальную фазу и летальную фазу. Прелетальная фаза воздействует повреждающее тремя путями: гипоксией, недостаточностью питания и неспособностью удаления токсических отходов обмена веществ. С прекращением циркуляции крови прекращается приток молекулярного кислорода. Наступившая гипоксия вызывает истощение энергетических запасов, таких как истощение запасов АТФ в митохондриях. Истощение АТФ ведет к клеточным изменениям, включая отек, утрату нормальной целостности клеток и утрату полярности мембран. Клеточные изменения вызывают летальную фазу ишемии, приводящую к накоплению метаболических отходов, активации протеаз и гибели клеток.

Современные перфузионные растворы, представляющие настоящее положение дел в вопросе гипотермической консервации органов, и поставляемые для оптимальной консервации органов в условиях гипотермии, содержат компоненты, которые предотвращают отек тканей, индуцированный гипотермией; метаболиты, которые облегчают функционирование органа после пересадки; антиоксиданты; стабилизаторы мембран; коллоиды, ионы и соли (Southard et al., 1990, Transpl. 49:251; и Southard, 1989, Transpl. Proc. 21:1195). Состав этого перфузионного раствора таков, что он сохраняет органы путем гипотермически индуцированного подавления метаболизма. В то время как он сводит к минимуму отек и вазоспазм, обычно наблюдающиеся при гипотермическом хранении, он не предназначен для использования при значительно расширенном донорском пуле.

Это обусловлено тем, что орган или ткань, сильно поврежденные тепловой ишемией, но функционально еще сохраненные, не могут перенести дальнейшего повреждения при гипотермии. Даже если ишемия длилась всего 30 минут, функция органа после пересадки может оказаться скомпрометированной. Например, при использовании органов, взятых от трупов с работавшим сердцем, частота нефункционирования органов сразу после пересадки составляет около 25%, а после 30 минут ишемии - возрастает приблизительно до 60%. Следовательно, 60% почек, взятых от трупов с неработающим сердцем, не начинают сразу работать вследствие прелетального ишемического повреждения. Помимо этого, полагают, что в органах, лишенных кровотока на несколько часов и менее, наблюдается необратимое ишемическое повреждение (Klutz et al., патент США 5395314). Пока не будут

разработаны новые источники органов для пересадки, количество операций по трансплантации будет оставаться постоянным. Помимо этого, донорский пул не может быть достаточно расширен, поскольку не существует способа и системы для восстановления прелетального ишемического повреждения в органах или тканях, поврежденных тепловой ишемией.

Недавние попытки фокусировались на предупреждении ишемического повреждения путем оживления органов реперфузией раствором немедленно после прекращения кровоснабжения. Например, защитный раствор, описанный в патенте США 4415556, используется при хирургических операциях или для органов, предназначенных для трансплантации, с целью предупреждения ишемического повреждения органа. Этот защитный раствор используется в качестве перфузионного для улучшения аэробного обмена при перфузии органа. Патент США 5395314 описывает способ оживления мозга путем циркуляции, после прекращения кровоснабжения, через мозг гипотермического консервирующего раствора (около 8-10°C), составленного таким образом, чтобы понижать метаболизм в органе, доставлять кислород и ингибировать свободнорадикальное повреждение.

Несмотря на то, что эти способы и консервирующие растворы пригодны для предупреждения ишемического повреждения органов, эти выгодные стороны затеняются практическими и функциональными недостатками. Во-первых, для того, чтобы эти способы и растворы были эффективны для предотвращения ишемического повреждения, они должны применяться немедленно (в течение минут) после прекращения кровоснабжения. Материально-технические проблемы, например, в случае, когда донором органа является жертва несчастного случая, могут сильно ограничивать применение таких способов и растворов, которые практичны только в условиях стационаров. Во-вторых, как полагают, необратимое ишемическое повреждение наблюдается в органах, лишенных кровоснабжения, в течение минут (например, в мозгу) или в течение нескольких часов (в сердце, почке). Орган или ткань, сильно поврежденные тепловой ишемией, но функционально еще сохраненные, не могут перенести дальнейшего повреждения при гипотермическом хранении перед трансплантацией или возобновления кровотока после трансплантации. Одной причиной является то, что восстановление кровообращения после ишемии-реперфузии парадоксальным образом может приводить к дальнейшему повреждению ткани (McCord et al., 1985, N Engl. J. Med. 312-159-163). Восстановление кровообращения вызывает реоксигенацию поврежденной ткани. Реоксигенация ишемически поврежденной ткани может привести к дальнейшему повреждению ткани вследствие образования радикалов свободного кислорода, истощения поглотителей свободных радикалов и высвобождения хемотаксических агентов.

Таким образом, существует потребность в способе и растворе, которые могли бы преодолеть, а не только ингибировать, эффекты ишемии в органах или тканях во время прелетальной фазы, способствовать

восстановительным процессам в органах или тканях на очень ранних стадиях летальной ишемии. Способ индуцирования восстановления ишемически поврежденных органов или тканей до такой степени, при которой нарушение функции может стать обратимым, при этом предотвращение дальнейшего повреждения ткани во время возобновления кровотока может привести к существенному расширению донорского пула.

Краткое описание существа изобретения  
Настоящее изобретение направлено на то, что вплоть до времени появления настоящего изобретения считалось необратимым ишемическим повреждением органов или тканей, лишенных кровоснабжения. Способ и композиции используются после ишемического повреждения для индуцирования восстановления ишемически поврежденных органов или тканей, а также предотвращения дальнейшего повреждения ткани во время возобновления кровотока. Это отличает способ и композиции настоящего изобретения от применяющихся в настоящее время способов и композиций, предназначенных для использования до ишемического повреждения, с целью предотвращения или ингибирования такого повреждения. Способ настоящего изобретения является способом, с помощью которого можно восстановить целостность и функцию ишемически поврежденного органа или ткани во время, по крайней мере, прелетальной фазы ишемии, применяя восстановительный раствор по настоящему изобретению. Далее, способ и раствор настоящего изобретения предназначены для предотвращения или ингибирования дальнейшего повреждения ткани, которое может наблюдаться при возобновлении кровотока в органе или ткани, лишенных кровоснабжения.

Способ настоящего изобретения включает промывание органа через артериальную систему восстановительным раствором настоящего изобретения в условиях высокой температуры, приблизительно от 28°C до 37 °C, для удаления крови и кислотических продуктов, которые накопились в органе или ткани во время периода отсутствия кровотока; и перфузию промытого органа или ткани восстановительным раствором с целью (1) расширить кровеносные сосуды, особенно спазмированные микрососуды, в органе или ткани; (2) восстановить функцию органа или ткани путем снабжения их трофическими факторами; (3) восстановить целостность и функцию клеток в ишемически поврежденном органе или ткани и (4) восстановить окислительный метаболизм путем реадaptации ишемически поврежденного органа или ткани, выживающих с помощью анаэробного дыхания, к оксигенированному восстановительному раствору; что делает орган или ткань пригодными для трансплантации и/или для восстановления циркуляции крови.

Краткое описание чертежей  
Фиг. 1 представляет блок-схему, показывающую процессы в органе, на которые действует восстановительный процесс и раствор по настоящему изобретению.

Фиг.2 представляет график зависимости параметра функции органа (сывороточный



креатинин) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аллотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Фиг.3 представляет график зависимости параметра функции органа (креатинин мочи) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аллотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Фиг.4 представляет график зависимости параметра функции органа (сывороточный креатинин) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аутоотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Фиг.5 представляет график зависимости параметра функции органа (креатинин мочи) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аутоотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

#### Определения

"Лишенный кровотока" здесь является термином, применяемым для целей описания и формулы изобретения, который относится к прекращению циркуляции крови через орган или ткань при любых обстоятельствах, в которых может быть прекращена циркуляция крови и появляется теплая ишемия. Эти обстоятельства включают прекращение сердечных сокращений для хирургических процедур или в силу естественных причин, таких как сердечный приступ.

"Орган или ткань" здесь является термином, применяемым для целей описания и формулы изобретения, который относится к почке, сердцу, печени, легкому, тонкой кишке, поджелудочной железе, мозгу, глазу и коже, но не ограничивается ими.

"Восстановительный раствор" здесь является термином, применяемым для целей описания и формулы изобретения, который относится к буферному физиологическому раствору, обеспечивающему средства для восстановления целостности и функции ишемически поврежденных органов, лишенных кровотока, а также для предотвращения или ингибирования дальнейшего повреждения тканей, которые могут наблюдаться при восстановлении циркуляции крови через орган, лишенный кровотока.

Способ настоящего изобретения является способом, посредством которого могут быть восстановлены целостность и функция ишемически поврежденного органа, по меньшей мере, во время фазы прелетальной ишемии, с использованием восстановительного раствора настоящего изобретения. Восстановление целостности и функции органов с помощью способа и композиций настоящего изобретения было неожиданным, поскольку к времени создания этого изобретения предполагалось, что ишемическое повреждение органов, лишенных кровотока в течение всего нескольких часов или менее, необратимо. Помимо этого, способ и раствор настоящего

изобретения предназначены для предотвращения или ингибирования дальнейшего повреждения тканей, которое может наблюдаться во время восстановления циркуляции крови в органе, лишенном кровотока.

Способ и раствор настоящего изобретения обеспечивают средства для удаления крови и ацидотических продуктов, накопившихся во время периода прекращения кровотока в органе; средства для восстановления клеточной целостности и функции, восстанавливая, таким образом, функцию органа; и средства для реадaptации органа к оксигенированной среде. Способность восстанавливать функцию органа после ишемического повреждения сочтена возможной, исходя из следующих предпосылок: (1) кровь не свертывается, находясь в контакте с жизнеспособными васкулярными эндотелиальными клетками и, следовательно, ишемически поврежденные органы можно реперфузировать, обеспечивая жизнеспособность и интактность этого эндотелия; (2) восстановление сосудистой динамики зависит от обеспечения адекватной вазодилатации, зависящей от эндотелиальных клеток, с целью адекватной перфузии и оксигенации ткани и обеспечения нормальных механизмов саморегуляции; (3) микрососуды для их оживления должны быть адекватно расширены, но нормальная их проницаемость не должна изменяться, чтобы можно было восстановить клеточную целостность; и (4) трофические факторы, утраченные во время ишемии, должны быть восполнены, а полярность клеток, необходимая для нормального функционирования, должна быть восстановлена.

Способ и раствор настоящего изобретения действуют совместно для оживления ишемически поврежденного органа с целью восстановления функции органа и реадaptации органа к оксигенированной среде. Фиг.1 представляет блок-схему, показывающую процессы в органе, на которые действует восстановительный процесс и раствор по настоящему изобретению.

Следующие примеры иллюстрируют предпочтительные варианты практического осуществления настоящего изобретения. В следующих вариантах осуществления, используемых для иллюстрирования, важно учитывать следующие соображения. Модель на теленке и модель на собаке были задействованы для оценки композиций и методов, относящихся к трансплантации органов, предназначенных для человека, поскольку было показано, что эти модели отражают физиологическую основу. Таким образом, хотя композиция и способ настоящего изобретения оценивались на этих экспериментальных моделях, эта композиция и способ должны использоваться прежде всего для человека. Физиологическая основа для экстраполяции данных от экспериментальных моделей на человека хорошо известна специалистам, и включает учет различий, таких как объемы органов и размеры кровотока через органы (см., например, Harrison et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66:1679-1683). Следует понимать, что эти примеры предназначены для

иллюстрации, а не для ограничений.

#### Пример 1 - Способ

Способ настоящего изобретения включает помощь в период отсутствия кровообращения в органе до того, как наступит значительная гибель клеток. Специалисту будет понятно, что этот период, в течение которого можно применять указанный способ, различен в зависимости от типа обрабатываемого органа. Например, промежуток времени, в течение которого обрабатывается сердце с помощью способа настоящего изобретения, может быть менее приблизительно одного часа; в то время как почку можно обрабатывать с помощью способа настоящего изобретения в течение приблизительно до 4 часов отсутствия кровотока. Чтобы остановить каскад ишемического повреждения, ведущий к гибели клеток, способом, показанным на фиг.1, способ настоящего изобретения включает стадии:

(i) промывания ишемически поврежденного органа через артериальную систему восстановительным раствором настоящего изобретения в условиях высокой температуры, приблизительно от 28°C до 37 °C, для (i) удаления крови и ацидотических продуктов, которые накопились в органе во время периода отсутствия кровотока;

(ii) восстановления клеточной среды до физиологических значений pH;

(iii) адекватного расширения микрососудов;

(iv) поддержания продолжающегося анаэробного метаболизма как спасательного процесса путем обеспечения высокоэнергетическими соединениями и поддержания гликолиза с помощью дополнительных субстратов, которые могут включать глюкозу, пируват и уридин-5'-трифосфат (УТФ), но не ограничиваются ими;

(v) инициирования перехода от анаэробного метаболизма к окислительному метаболизму путем обеспечения метаболическими субстратами для восполнения пула адениновых соединений, поддержания цикла лимонной кислоты и восстановления системы транспорта электронных пар, в то время как молекулярный кислород вводится медленно, чтобы избежать реперфузионного повреждения, опосредуемого токсичностью кислорода;

(vi) создания механизма для адекватной вазодилатации микрососудистого ложа эндотелиальных клеток внутри сильно спазмированного, отекающего, ишемически поврежденного органа, без значительного изменения проницаемости органа; причем эта вазодилатация делает возможной адекватную перфузию ткани органа, что создает стабильное давление перфузии, стабильную скорость тока жидкости и постоянную температуру, постоянную величину pH и постоянную оксигенацию;

(vii) обеспечения трофическими факторами для восстановления функции ишемически поврежденного органа, обеспечивая, таким образом, метаболиты для восстановления клеточной целостности и функции; и

2) перфузии ишемически поврежденного

органа через артериальную систему восстановительным раствором настоящего изобретения в условиях высокой температуры, приблизительно от 28°C до 37 °C, для

(i) нормализации оксигенирования, температуры и pH;

(ii) продолжения обеспечения механизма для адекватного расширения сосудистого русла органа, без существенного изменения проницаемости органа, обеспечивая, таким образом, стабильное давление перфузии и стабильную скорость тока жидкости; и

(iii) продолжения обеспечения трофическими факторами для восстановления функции ишемически поврежденного органа, обеспечивая, таким образом, метаболиты для восстановления клеточной целостности и функции, такого как упрочение межклеточных соединений и восстановление полярности мембран.

Специалисту будет понятно, что один или более благоприятных эффектов, достигнутых на этапе промывания, будут продолжаться также на этапе перфузии, поскольку восстановительный раствор настоящего изобретения можно использовать на протяжении всего процесса, т.е., включая стадии промывания и перфузии.

Для целей иллюстрации, но не ограничения, на стадии промывания достаточное количество восстановительного раствора медленно вводят вливанием через канюлю в главную для данного конкретного органа артерию до тех пор, пока вытекающая жидкость не будет больше содержать крови. Этим способом ишемическая кровь и ацидотические продукты, которые накопились в сосудах за период времени, в течение которого орган был лишен кровоснабжения, удаляются из сосудов. Далее, восстанавливается pH и доставляется свежий субстрат для поддержания анаэробного метаболизма и других путей обмена в клетке, необходимых для клеточной целостности и функции. Специалисту будет ясно, что количество восстановительного раствора, достаточное для промывания, может зависеть от конкретного вида и размеров органа, который промывают, а также от продолжительности периода времени, в течение которого отсутствовало кровоснабжение. Для иллюстрации, но не для ограничения, от 200 до 600 мл восстановительного раствора может быть достаточным для промывания почки человека, в которой отсутствовал кровоток в течение 1-3 часов.

Для целей иллюстрации, но не ограничения, на этапе перфузии достаточное количество восстановительного раствора медленно перфузируют при систолическом давлении, подходящем для ишемически поврежденного органа, который оживляют, до тех пор, пока не достигают скорости тока жидкости, которая является приблизительно нормальной для этого конкретного типа органа. Для иллюстрации, но не для ограничения, почку человека, в которой отсутствовал кровоток в течение 1-3 часов, можно медленно перфузировать восстановительным раствором при систолическом давлении <80 мм рт.ст., до тех пор, пока скорость тока жидкости не достигнет >50 мл/мин. pH нормализуется до

физиологических пределов путем медленного введения молекулярного кислорода через оксигенатор или через вещество, транспортирующее кислород, являющееся составной частью восстановительного раствора. Оксигенация органа во время перфузии, а также нормализация температуры и pH, наблюдается приблизительно в течение первых 15-30 минут перфузии. Поскольку сосуды органа медленно расширяются, давление перфузии и скорость тока жидкости начинают стабилизироваться, и орган быстро переключается на окислительный метаболизм. Специалисту будет понятно, что продолжительность времени, необходимого для перфузии, зависит от конкретного типа и размеров перфузируемого органа, а также от продолжительности периода отсутствия кровообращения. Однако обработка ишемически поврежденного органа с помощью способа настоящего изобретения (промывания и перфузии) приблизительно в течение 2 часов может быть достаточной при оживлении большинства органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени от 0,5 до 4 часов) для восстановления их функции. Также, если орган вырабатывает какой-то продукт, как, например, почка вырабатывает мочу, этот способ может приводить к появлению выработки продуктов нормальной деятельности органа.

Способ настоящего изобретения был разработан для консервации и оживления ишемически поврежденных органов *ex vivo* без использования традиционной гипотермии (4-10°C). Этот способ обеспечивает необходимую доставку кислорода, питательные вещества для метаболизма, онкотическое давление, pH, перфузионное давление и скорость тока жидкости для поддержания метаболизма органа *ex vivo* чаще всего в пределах соответствующих нормальных значений этих величин *in vivo* или около того. Почти нормальная скорость метаболизма здесь определяется как приблизительно 70-90% нормальной скорости метаболизма. Далее, способ настоящего изобретения поддерживает такой уровень метаболизма *ex vivo*, который обеспечивает окислительный метаболизм, достаточный для выработки нормального функционального продукта этого органа. Разработка этого способа, который поддерживает органы *ex vivo* без традиционной гипотермии, предоставляет возможность поддерживать почти нормальную скорость метаболизма и восстанавливать функциональные возможности, которые могут быть соотнесены с послеоперационным или посттрансплантационным течением.

В еще одном варианте осуществления способ настоящего изобретения можно осуществлять с помощью устройства, включающего ламинарную или пульсирующую насосную систему для доставки восстановительного раствора, включая средства для обеспечения и контроля перфузии и перфузионного давления; средства для контроля температуры и средства для обеспечения и контроля введения и выведения дыхательных газов. Подобное устройство описано автором настоящего изобретения в патентной заявке

США 08/246801, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. Такое устройство может также включать средства для тестирования и/или сбора перфузата, который уже прошел через орган к монитору, и измерения одной или более функциональных характеристик, таких как pH, различные виды давления, скорость тока жидкости, сосудистое сопротивление, различные химические составляющие, оксигенация, концентрация диоксида углерода и потребление кислорода. Помимо этого, можно использовать еще одно устройство или второе устройство в соединении с первым, для определения и/или сбора продукта, вырабатываемого органом, такого как моча, вырабатываемая почкой; причем последующее определение параметров этого продукта, вырабатываемого органом, может соотноситься с целостностью и функцией органа во время или после применения способа настоящего изобретения.

Пример 2 - Восстановительный раствор

Растворы для консервации и перфузии органа известны как растворы, включающие основной раствор, который состоит из буферного физиологического раствора, такого как солевой раствор или основная среда, подобная среде для культур клеток, к которому добавляют разнообразные дополнительные вещества. В предпочтительном варианте осуществления восстановительный раствор настоящего изобретения также включает подобный основной раствор, содержащий аминокислоты, ионы, физиологические соли, непроникающие вещества, сывороточные белки и/или факторы и сахара. Помимо компонентов основного раствора, восстановительный раствор настоящего изобретения содержит новую комбинацию дополнительных веществ, которые могут быть сгруппированы по меньшей мере в 3 категории компонентов. Специалисту будет понятно, что компоненты каждой категории могут заменяться функционально эквивалентным соединением для достижения того же самого результата. Таким образом, следующие перечисленные виды компонентов каждой категории компонентов служат целям иллюстрации, но не ограничения.

Первая категория компонентов, вазодилаторы, включает комбинацию компонентов в физиологически эффективных количествах, которые обеспечивают средство для адекватного расширения крупных сосудов через клеточное расслабление гладкой мускулатуры сосудов, а также для адекватного расширения микрососудов. Для того, чтобы гарантировать нормальную проницаемость сосудистого русла, вазодилатацию контролируют в условиях зависимости от эндотелиальных клеток. Такая комбинация компонентов может включать (1) субстраты для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, такие как ацетилхолин, допамин, брадикинин и аргинин; (2) субстраты для расширения микрососудов, такие как простаглицлин (и аналоги, например, карбаглицлин) и  $Mg^{+}$ ; и (3) аденозин (и аналоги, например, циклогексиладенозин), и верапамил для их объединенного действия на расширение сосудов, опосредуемого



блокированием кальциевых каналов (другие блокаторы кальциевых каналов включают флунаризин, нифедипин, SNX-11, хлорпромазин и дилтиазем). Результатом применения такой комбинации вазодилататоров является то, что сосудистое русло хорошо расширяется, одновременно сохраняя свою целостность и нормальную барьерную функцию. Вазодилататоры составляют приблизительно от 1 до 50% (масса/объем) от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют к основному раствору при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

Вторая категория компонентов, химические энергетические субстраты, включают комбинацию компонентов в физиологически эффективных количествах, которые обеспечивают средство для восстановления окислительного метаболизма, утраченного в течение периода отсутствия кровотока. Во время периода отсутствия кровотока возникающая утрата целостности мембран приводит к потере внутриклеточных компонентов, таких как ионы, компоненты пула адениновых соединений, цикла лимонной кислоты и цепочки транспорта электронных пар. Такие химические энергетические субстраты, добавляемые в восстановительный раствор, могут включать пируват, глюкозу, АТФ, АМФ, кофермент

А,  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотид

(НАД<sup>+</sup>,  $\beta$

-никотинамидадениндинуклеотидфосфат

(НАДФ<sup>+</sup>), флавинадениндинуклеотид (ФАД),

тиаминапирозинфосфат хлорид (кокарбоксилазу),

уридин-5-трифосфат (УТФ), хлорид,

аденозин, магний и их комбинации. Если

снабжение энергией в клетках ткани

восстановлено до гибели клеток, клеточные

изменения, возникшие в период отсутствия

кровотока, могут стать обратимыми, а

клеточный объем ткани возвращается к

норме. Химические энергетические субстраты

составляют приблизительно от 0,01 до 90% от

объема новой комбинации дополнительных

веществ, которую добавляют к основному

раствору при составлении

восстановительного раствора настоящего

изобретения.

Третья категория компонентов,

трофические факторы, включает комбинацию

компонентов в физиологически эффективных

количествах, которые обеспечивают средство

для ускорения одного или более

восстановительных процессов в клетках, с

целью восстановления клеточной функции,

утраченной в период отсутствия кровотока.

Эта комбинация трофических факторов

обеспечивает средство для ускорения

синтеза белка, что приводит к

восстановлению плотных межклеточных

соединений и к регенерации полярности

мембран, восстанавливая, таким образом,

функцию клеток. Такие трофические факторы,

добавляемые в восстановительный раствор,

могут включать высокие концентрации

аминокислот и магния (например, в 2-6 раз

больше обычных концентраций в плазме),

производные нуклеиновых кислот и

рибонуклеозиды; а также факторы роста с

потенциаторами мембран, такие как кислый

фактор роста фибробластов (ФРФ), основной ФРФ, гепарин и хондроитинсульфат, и их комбинации. Эти трофические факторы составляют приблизительно от 1 до 90% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют и растворяют в основном растворе при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

Специалисту будет понятно, что компоненты из одной или более упомянутых категорий могут нести дополнительные функции, желательные для способа настоящего изобретения. Например, ионы магния (введенные в состав как часть соединения, содержащего магний) действуют и как вазодилататор, и как химический энергетический субстрат; а глюкоза действует и как трофический фактор, и как химический энергетический субстрат. Помимо этого, в предпочтительном варианте осуществления аминокислоты, содержащиеся в восстановительном растворе, включают цистин и цистеин в количествах, которые, помимо функционирования в качестве трофических факторов, также действуют как антиоксиданты - избирательные поглотители свободных радикалов, которые поглощают токсичные свободные радикалы во время стадий промывания и перфузии настоящего способа. Другие антиоксиданты, такие как глутатион, циклодекстрин, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, хлорпромазин и простагландин, также могут включаться, или использоваться как функционально эквивалентные соединения в восстановительном растворе настоящего изобретения. Эти антиоксиданты составляют приблизительно от 0,000% до 10% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют и растворяют в основном растворе при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, при котором ткань, которую нужно оживать с помощью восстановительного раствора настоящего изобретения, является нервной тканью (например, головной мозг), восстановительный раствор может дополнительно включать нейропротекторы, такие как агенты, блокирующие рецепторы NMDA (блокаторы ионных каналов рецепторов NMDA, например, Аптиганел и Церестат; блокаторы глициновых участков рецепторов NMDA, например, ZD 9379 и GV 150-562A), блокаторы аккумуляции оксида азота (NO) (например, лубелузол) и блокаторы натриевых каналов для ингибирования притока натрия в клетки, что может инициировать высвобождение глутамата (например, BW619-C89, фосфениоин).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, помимо введения молекулярного кислорода через оксигенатор, восстановительный раствор содержит одно или более переносящих кислород соединений ("переносящие кислород агенты"), которые поставляют молекулярный кислород для окислительного метаболизма в ишемически поврежденный орган. Такие несущие кислород агенты известны специалистам и включают гемоглобин, стабилизированные



производные гемоглобина (изготовленные из гемолизированных эритроцитов человека, такие как пиридоксилированный гемоглобин), полиоксэтиленовые конъюгаты (РНР), рекомбинантные гемоглобиновые продукты, перфторхимические (ПФХ) эмульсии и/или перфторхимические микропузырьки (здесь общее название "перфторхимические агенты"), но не ограничиваются ими. Эти переносящие кислород агенты составляют приблизительно от 0,000% до 50% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют и растворяют в основном растворе при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения; или приблизительно от 0,000% до 20% от общего объема восстановительного раствора (об./об.).

Эмульсии ПФХ, пригодные в качестве переносящих кислород агентов, описаны, например, в патентах США 5403575, 4868318, 4866096, 4865836, 4686024, 4534978, 4443480, 4423077, 4252827, 4187252, 4186253, 4110474 и 3962439. Такие жидкие эмульсии ПФХ включают перфтороктилбромид, перфтороктилдибромид, бромфторуглероды, перфторэфиры, Fluosol DA™, F-44E, 1,2-бисперфторбутилэтилен, F-4-метилоктагидрохинолидизин, перфторамины от 9 до 12 атомов углерода, перфтордекалин, перфториндан, перфтортриметил бицикло [3, 3, 1]онан, перфторметиладамант, перфтордиметиладамантан, но не ограничиваются ими. Микропузырьки ПФХ, пригодные в качестве переносящих кислород агентов, описаны, например, в патентах США 5409688 и 5393524. Агенты ПФХ, которые описаны как пригодные для создания таких микропузырьков, включают, но не ограничиваются ими, додекафторпентан (ДДФП), гексафторид серы, пентан, гексафторпропилен, октафторпропан, гексафторэтан, октафтор-2-бутин, гексафторбута-1,3-диен, изопрен, октафторциклобутан, декафторбутан, цис-2-пентен, диметилсульфид, этиларсин, бромхлорфторметан, транс-2-пентен, 2-хлорпропан, гексафтордисульфид, этилмеркаптан, диэтиловый эфир, этилвиниловый эфир, валилен, трисфторарсин, фурфурилбромид, цис-пропенилхлорид, бутилфторид, 1,1-дихлорэтан, изопропилметилловый эфир, изопропиламин, метилформиат, 2-ацетилфуран, этиленфторид, 1-пентен, изопропилацетилен, перфторпентан, изопентан, виниловый эфир, 2-бутин, 1,4-пентадиен, тетраметилсилан, диметилфосфин, дибромдифторметан, 2-хлорпропен, дифториодметан, ацетальдегид, триметилбор, 3-метил-2-бутен, 1,1-диметилциклопропан, аминокэтан, винилбромид, дисиланометан, трихлорфторметан, бромфторметан, трифтордихлорэтан, перфторпентен и другие фторсодержащие углеводороды (патент США 5409688).

В процессе изготовления восстановительного раствора настоящего изобретения к основному раствору добавляют и растворяют в нем новую комбинацию дополнительных веществ, которые можно разделить на 3 категории, включая

вазодилататоры, химические энергетические субстраты и трофические факторы. Несмотря на то, что композиция восстановительного раствора для использования в способе настоящего изобретения может меняться по содержанию компонентов и их количеству, как описано выше, предпочтительный состав приводится в таблице 1 для целей иллюстрации, но не ограничения (заметьте, что для ясности компонент, который может функционировать в более чем одной из по меньшей мере трех категориях, помещен в одну категорию, внизу).

Приготовленные таким образом восстановительный раствор должен иметь осмолярность >330 мОсм, но предпочтительно, менее 600 мОсм, и в предпочтительном диапазоне приблизительно от 350 мОсм до 400 мОсм. pH восстановительного раствора следует довести до пределов приблизительно от 6,5 до 7,5, и предпочтительно, от 7,3 до 7,45.

Как указывалось, в другом варианте осуществления восстановительный раствор может также включать дополнительные антиоксиданты и один или более переносящих кислород агентов, следующим образом (на литр основного раствора):

Антиоксиданты - Количество

Глутатион - 0,1 мг

Циклодекстрин - 500 мг

Переносящий кислород агент  
перфторхимический агент - 20 об. %

Пример 3 - Эффект прекращения кровотока

Были проведены эксперименты, показывающие влияние тепловой ишемии, вызванной прекращением кровотока в органе приблизительно на 30 минут. Такая теплая ишемия приводит к быстрому нарушению целостности клеток. Каскад ишемического повреждения начинается с утраты пула адениновых соединений, что приводит к отеку. Потеря целостности клеток и появление отека приводит к сосудистому коллапсу и нарушению нормальной проницаемости сосудов. Можно видеть, что в органе, таком как почка, ишемическое повреждение, вызванное прекращением кровотока в почке всего на 30 минут, вызывает сильный спазм сосудов. Этот выраженный сосудистый спазм так изменяет скорость тока жидкости, что она становится недостаточной для адекватной перфузии почки. Высокое сосудистое сопротивление в спазмированных сосудах приводит к дальнейшему ухудшению вторичной гипоксии и тем самым к потере функциональных возможностей (т.е., к прекращению выработки мочи). Таблица 2 иллюстрирует сравнение перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (выработка мочи) на экспериментальных животных моделях, включая почки теленка, в которых кровоток не прекращался ("нормальные") и включая почки теленка, в которых кровоток прекращали всего на 30 минут ("ишемические"). Сосудистое сопротивление представляет среднее давление/средняя скорость тока жидкости.

Пример 4 - Эффекты способа оживления и восстановительного раствора.

Были проведены эксперименты с целью продемонстрировать способность способа

оживления и восстановительного раствора настоящего изобретения преодолевать, а не только ингибировать, эффекты тепловой ишемии в органах, и поддерживать процесс восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление нарушенной функции органа. Почки изымали у умерщвленных телят крупного рогатого скота. После 30 или 60 минут отсутствия кровотока почки удаляли срединным разрезом. До удаления почек не предпринимали никакого воздействия, в том числе, введения антикоагулянтов. Каждая контрольная почка лишалась кровотока на 30 минут, подвергаясь, таким образом, в этот период ишемическому повреждению. После удаления контрольные почки промывали 100 см<sup>3</sup> основной среды для культур клеток при температуре 32°C, так, что почки отмывали от крови, оставшейся в сосудистом русле. Каждая экспериментальная почка лишалась кровотока на 60 минут, подвергаясь, таким образом, в этот период ишемическому повреждению. После удаления экспериментальные почки промывали 100 см<sup>3</sup> восстановительного раствора настоящего изобретения при температуре 32°C. После промывания через эти почки прокачивали с помощью модифицированной системы для консервации органов во время транспортировки MOX-100™. Контрольные почки прокачивали при 32°C используя ранее известные методики для консервации органов с помощью технологии тепловой консервации, используя в качестве перфузионного раствора основную среду для культур клеток. Экспериментальные почки прокачивали, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при 32°C. Сравнение перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (выработка мочи) в контрольной группе (30 минут ишемии) и в экспериментальной группе (60 минут ишемии) показано в таблице 3.

Экспериментальные почки, подвергавшиеся ишемическому повреждению в течение одного часа, которые затем оживляли с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, демонстрировали перфузионные характеристики (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функцию органа (выработка мочи) в функциональных пределах нормальных почек, представленных в таблице 2. Таким образом, показана способность способа и восстановительного раствора настоящего изобретения преодолевать, а не только ингибировать, эффекты тепловой ишемии в органах, и поддерживать процесс восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление функции органа.

Пример 5 - Эффективность при разной продолжительности периода повреждения

Были проведены эксперименты с целью оценить эффекты способа и восстановительного раствора настоящего изобретения в органах, которые были лишены кровотока на периоды времени более 1 часа. Почки изымали у умерщвленных телят крупного рогатого скота через различные периоды времени отсутствия кровотока,

включая 60 минут, 90 минут, 2 часа или 4 часа. До удаления почек не предпринимали никакого воздействия, в том числе, введения антикоагулянтов. Каждую почку затем промывали 100 см<sup>3</sup> восстановительного раствора настоящего изобретения при температуре 32°C. Ни разу, ни в одной почке не обнаруживали свернувшейся крови в сосудистом русле. Кровь появлялась в оставшейся жидкости, поскольку она находилась в контакте с жизнеспособным эндотелием кровеносных сосудов. После промывания эти почки прокачивали в течение нескольких часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при 30°C. Сравнение средних перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (концентрация креатинина в моче - клиренс креатинина; гистология) в почках, лишенных кровотока на 60 минут (60'), в почках, лишенных кровотока на 90 минут (90'), в почках, лишенных кровотока на 2 часа (120') и в почках, лишенных кровотока на 4 часа (240') показано в таблице 4.

Результаты свидетельствуют о том, что способ и восстановительный раствор настоящего изобретения могут оживать ишемически поврежденный орган, лишенный кровотока на период по меньшей мере до 4 часов. Например, когда почку, перенесшую теплое ишемическое повреждение в течение 60 минут, прокачивают в течение 2 часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, перфузионные характеристики эквиваленты тем, которые наблюдаются в нормальной почке, как представлено в таблице 1. Гистологические оценки подтверждают функциональные данные, так как исследованные срезы тканей показали, что морфология и целостность хорошо сохранились.

При лишении кровотока на 90 и 120 минут состояние почек отражало более обширные клеточные повреждения (т.е., повышенное диастолическое давление и сниженные скорости тока жидкости) по сравнению с почками, лишенными кровотока на 60 минут. Тем не менее, несмотря на такие повреждения клеток, эти почки все же вырабатывали мочу, а гистологически они представлялись хорошо сохранившимися. Помимо этого в этих почках не было обнаружено некроза.

В почках, лишенных кровотока на 4 часа, наблюдались значительно сниженные скорости тока жидкости, а также сопутствующее повышение диастолического давления, которое включает спазм сосудистого ложа. Однако, важно отметить, что эти почки все еще функционировали. Моча вырабатывалась с содержанием креатинина 23,5 мг/дл. Гистологически в этих почках наблюдались первые признаки точечного раннего некроза. По соседству с очагами точечного тубулярного некроза наблюдались признаки митотической активности, указывающие на начало активного восстановительного процесса. Таким образом, даже после 4 часов лишения кровотока была показана способность способа и восстановительного раствора

настоящего изобретения преодолевать, а не только ингибировать, действие тепловой ишемии на органы, и поддерживать процесс восстановления до такой степени, при которой нарушение функции может стать обратимым.

Важно отметить, что контрольные почки (без обработки с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения) оценивали гистологически через 2 или 4 часа отсутствия кровотока с целью определить относительные преимущества этого способа и восстановительного раствора. Гистологическая оценка контрольных почек, подвергшихся 2-часовой тепловой ишемии, показала ранний диффузный тубулярный некроз. После 4-часовой тепловой ишемии в контрольных почках наблюдалось диффузное разрушение клеток канальцев. Напротив, в почках, подвергшихся 2-часовой тепловой ишемии, а затем обработанных с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, наблюдалось восстановление целостности клеток. Далее, в почках, подвергшихся 4-часовой тепловой ишемии, а затем обработанных с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, наблюдался только точечный тубулярный некроз, по сравнению с распространенным повреждением канальцев в контрольных почках. Гистологическая оценка впоследствии подтвердила значительную эффективность способа и восстановительного раствора настоящего изобретения в отношении реверсии каскада процессов тепловой ишемии после лишения кровотока.

Пример 6 - Функция реанимированного органа *in vivo*

#### А. Аллотрансплантация

Орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, оценивали на функцию *in vivo* после оживления. Была выполнена аллотрансплантация собаке; почку брали у собаки-донора спустя 60 минут после посмертной остановки кровообращения; промывали орган восстановительным раствором настоящего изобретения; и перфузировали его в течение 2 часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при температуре 30-32°C. После процесса оживления почку затем пересаживали собаке-реципиенту с одновременной билатеральной нефрэктомией почек реципиента. Таким образом, выживание собаки-реципиента зависело от реанимированной почки. Течение посттрансплантационного периода у собаки-реципиента показано на фиг.2 и 3.

Почка хорошо реперфузировалась и вырабатывала мочу через два часа после пересадки. Почка продолжала вырабатывать мочу в течение всего периода посттрансплантационного наблюдения. Как показано на фиг.2, у реципиента наблюдался небольшой подъем сывороточного креатинина до уровня выше 2 мг/дл через 24 часа после пересадки. Уровень сывороточного креатинина возвратился к нормальным значениям через 48 часов после пересадки. Биохимические показатели сыворотки оставались нормальными до

десятого дня после пересадки, когда произошло острое отторжение пересаженного органа (собака-реципиент получала недостаточную иммуносупрессивную терапию). Как показано на фиг.3, уровень креатинина в моче быстро возрастал и достигал нормальных пределов около 70 мг/дл через 48 часов после пересадки. Этот очень незначительный эпизод острого тубулярного некроза (ОТН), наблюдавшийся первоначально, быстро претерпел обратное развитие через 48 часов после пересадки. Обратимый характер острого тубулярного некроза, наряду со способностью пересаженной почки поддерживать длительное выживание реципиента, показал жизнеспособность и функционирование *in vivo* пересаженного органа, который перенес период тепловой ишемии продолжительностью более 60 минут. Таким образом, орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, после оживления может работать *in vivo*.

#### В. Аутооттрансплантация

В другом варианте орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, оценивали на функцию *in vivo* после оживления. Используя двух собак, выполнили аутооттрансплантацию путем удаления левых почек, которые затем подтверждались тепловой ишемией в бане с физиологическим раствором при 37°C в течение 2 часов. После периода тепловой ишемии в почки вставляли канюли и промывали их восстановительным раствором настоящего изобретения, а затем перфузировали их в течение 2 часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при температуре 30-32°C. После процесса оживления почки аутооттрансплантировали с одновременной нефрэктомией необработанной, контралатеральной почки. Таким образом, выживание каждой собаки-реципиента целиком зависело от реанимированной почки. Течение посттрансплантационного периода у собак-реципиентов показано на фиг.4 и 5.

Почки хорошо реперфузировались и вырабатывали мочу через часы после пересадки. Почки продолжали вырабатывать мочу в течение всего периода посттрансплантационного наблюдения. Как показано на фиг.4, у обеих собак наблюдался небольшой подъем сывороточного креатинина, согласующийся с ОТН. В каждом случае пик сывороточного креатинина наблюдался на третий день после пересадки и составлял 3,5 мг/дл и 2,8 мг/дл, соответственно. Однако уровни сывороточного креатинина возвратились к нормальным значениям через 10 дней после пересадки. Биохимические показатели сыворотки оставались нормальными в течение оставшейся части посттрансплантационного периода. Как показано на фиг. 5, уровни креатинина в моче быстро возрастали и достигали нормальных пределов за несколько дней до нормализации биохимических показателей сыворотки. После умерщвления животных гистологическое исследование показало практически нормальные почки. Эти исследования



показательны в смысле регенерации эпителия канальцев. Обратимый характер острого тубулярного некроза, наряду со способностью пересаженной почки поддерживать длительное выживание реципиента, показал жизнеспособность и функционирование *in vivo* пересаженного органа, который перенес период тепловой ишемии продолжительностью более 2 часов. Таким образом, орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, после оживления может работать *in vivo*.

Пример 7 - Сравнение с известными консервирующими растворами

Органы оживляли, применяя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения или известный консервирующий раствор (основную культуральную среду RSM-210<sup>TM</sup> или VIA-SPAN<sup>TM</sup>), а затем сравнивали функцию и гистологию органов. Каждую группу почек, перенесших 60-минутное прекращение кровотока, промывали при 32°C соответствующим раствором, а затем перфузировали в течение 2 часов соответствующим раствором: VIASPAN<sup>TM</sup> при 4°C или RSM-210<sup>TM</sup> или восстановительным раствором настоящего изобретения при 30-32°C, используя один и тот же способ оживления. Сравнение средних перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (концентрация креатинина в моче; гистология) в почках, лишенных кровотока на 60 минут и обработанных соответствующим раствором показано в таблице 5.

Результаты, представленные в таблице 5, показывают, что восстановительный раствор настоящего изобретения обладает способностью восстановления сосудистых характеристик, а также функции ишемически поврежденных органов, превосходящей способности VIASPAN<sup>TM</sup> и RSM-210<sup>TM</sup>. Например, в почках, промытых и перфузируемых восстановительным раствором настоящего изобретения в процессе оживления, наблюдалась уменьшенная вазоконстрикция и более высокие скорости тока жидкости по сравнению с почками, промытыми и перфузируемыми RSM-210<sup>TM</sup> или VIASPAN<sup>TM</sup>. Также, почки, промытые и перфузируемые восстановительным раствором настоящего изобретения, были единственными, у которых восстановилась их функция, что выразилось в выработке мочи с сопутствующей секрецией креатинина. Гистологически только почки, промытые и перфузируемые восстановительным раствором настоящего изобретения или RSM-210<sup>TM</sup>, были восстановлены и достаточно сохранили, о чем свидетельствовала хорошо сохранившаяся архитектура почечной ткани. Напротив, почки, промытые и перфузируемые раствором VIASPAN<sup>TM</sup>, обнаруживали признаки гистологического повреждения, включая набухание клубочков и тубулярный некроз. Продемонстрирована превосходная способность, по сравнению с известными специалистами растворами, способа и восстановительного раствора настоящего изобретения преодолевать воздействие

теплой ишемии на органы и поддерживать восстановительный процесс до такой степени, при которой нарушение функции органа может стать обратимым.

Пример 8 - Доставка кислорода во время процесса оживления

Как обсуждалось подробно выше, в одном варианте осуществления настоящего изобретения в композицию восстановительного раствора включают в качестве компонента один или более переносящих кислород агентов. Оценивались эффекты различных переносящих кислород агентов как компонентов восстановительного раствора, и их относительная роль в доставке молекулярного кислорода; а также способность способа и восстановительного раствора настоящего изобретения поддерживать осуществляющийся окислительный метаболизм.

Восстановительный раствор, не содержащий переносящего кислород агента (в таблице 6 обозначен "BP"); восстановительный раствор, содержащий промытые эритроциты (в таблице 6 обозначен "BP-ЭР"; 15 об.%); восстановительный раствор, содержащий очищенный гемоглобин (в таблице 6 обозначен "BP-Гем"; 60 см<sup>3</sup>/литр коммерческого препарата); и восстановительный раствор, содержащий перфторхимическую эмульсию (в таблице 6 обозначен "BP-ПФХ"; 20 об.%) использовали для оживления почек, перенесших 60-минутную теплую ишемию. Каждую группу почек, перенесших 60-минутное прекращение кровотока, промывали при температуре 30-32°C, используя соответствующий раствор, а затем перфузировали при 30-32°C в течение 2 часов соответствующим раствором, используя один и тот же способ оживления. Сравнение средних перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (концентрация креатинина в моче; гистология) в почках, лишенных кровотока на 60 минут и обработанных соответствующим раствором показано в таблице 6.

Результаты, представленные в таблице 6, показывают, что по мере возрастания концентрации молекулярного кислорода в восстановительном растворе через посредство более эффективного переносящего кислород агента, как компонента восстановительного раствора, функция органа улучшается как результат процесса оживления. Например, эффективные переносящие кислород агенты, перфторхимические или очищенный гемоглобин, обеспечивают более высокую концентрацию молекулярного кислорода, доставляемого в процессе оживления. Функция почек, обработанных восстановительным раствором, содержащим один из этих переносящих кислород агентов, улучшается по сравнению с функцией почек, обработанных восстановительным раствором, не содержащим добавленного переносящего кислород агента или содержащим менее эффективный переносящий кислород агент. Например, при использовании восстановительного раствора с очищенным гемоглобином или перфторхимическим агентом, согласно настоящему изобретению, средняя концентрация креатинина в моче

составила 18 мг/дл и 41,8 мг/дл, соответственно. Напротив, когда в процессе оживления не используется оксигенатор, а восстановительный раствор не содержит несущего кислород агента, или содержит низкую концентрацию отмытых эритроцитов, средняя концентрация креатинина в моче составляет 8,4 мг/дл и 8,3 мг/дл, соответственно. Продemonстрирован другой вариант осуществления восстановительного раствора, в котором при добавлении одного или более эффективных переносящих кислород агентов в качестве компонента раствора улучшалась функция ишемически поврежденного органа, обрабатываемого с помощью способа настоящего изобретения.

#### Пример 9

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на печень, лишенную кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление ее функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденной печени с помощью способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую функцию печени, а также отдельные аспекты физиологии печени, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в секрете печени (желчи). Функциональные характеристики печени можно оценить путем определения некоторых параметров, включая, но не ограничиваясь ими, концентрации в желчи желчных солей, холестерина, щелочной фосфатазы; pH желчи и скорость тока жидкости через сосуды печени, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденную печень можно обработать, а затем оценить ее перспективы в отношении метаболической функции.

#### Пример 10

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на поджелудочную железу, лишенную кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление ее нарушенной функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденной поджелудочной железы с помощью способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую функцию поджелудочной железы, а также отдельные

аспекты физиологии поджелудочной железы, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в поджелудочной железе. Функциональные характеристики поджелудочной железы включают концентрации панкреатических ферментов, таких как амилаза, липаза; гормона инсулина; pH, натрий и калий панкреатического секрета, и скорость тока жидкости через сосуды поджелудочной железы, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденную поджелудочную железу можно обработать, а затем оценить ее перспективы в отношении метаболической функции.

#### Пример 11

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на сердце, лишенное кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление его функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденного сердца с помощью способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления нарушенной функции органа. Общую функцию сердца, а также отдельные аспекты физиологии сердца, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в сердце. Функциональные характеристики сердца включают, но не ограничиваются ими, механическую и электрическую работу, ферменты сердца, такие как трансаминазы (аспартатаминотрансфераза, АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), фруктозо-1,6-дифосфат альдолаза (АЛД), малатдегидрогеназа (МДГ), глутатионредуктаза (ГР), креатинфосфокиназа (КФК), гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБД); скорость тока жидкости через сосуды сердца, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденное сердце можно обработать, а затем оценить его перспективы в отношении метаболической функции.

#### Пример 12

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на тонкий кишечник, лишенный кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление его нарушенной функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденного тонкого кишечника с помощью

способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую функцию тонкого кишечника, а также отдельные аспекты физиологии тонкого кишечника, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в тонком кишечнике. Функциональные характеристики тонкого кишечника можно оценить путем определения некоторых параметров, включающих, но не ограничивающихся ими, функциональные исследования, такие как тесты на стимуляцию кислотообразования в желудке, и тесты на всасывание, с использованием меченых молекул; скорость тока жидкости через сосуды тонкого кишечника, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденный тонкий кишечник можно обработать, а затем оценить его перспективы в отношении метаболической функции.

#### Пример 13

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на легкое, лишенное кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление его нарушенной функции. Может быть желательным сначала обработать легочный трансплантат поверхностно-активным веществом непосредственно перед перфузией (см. например, Erasmus et al., 1996, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153:665-670). Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденного легкого с помощью способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую легочную функцию, а также отдельные аспекты физиологии легкого, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, таких как сурфактант белок А (СБ-А). Функциональные характеристики легкого можно оценить путем определения некоторых параметров, включающих, но не ограничивающихся ими, ФЖЕЛ (форсированную жизненную емкость легких), ОФВ1 (объем форсированного выдоха за 1 секунду), ПОСВ (пиковую объемную скорость выдоха), АО (средний альвеолярный объем), ОЕЛ (общую емкость легких) и ПСО (перенос оксида углерода). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденное легкое можно обработать, а затем оценить его перспективы в отношении метаболической функции.

Следует понять, что описанные варианты

практического осуществления настоящего изобретения и приведенные примеры служат только целям иллюстрации, а не ограничения, и любые изменения или модификации, которые будут очевидны для опытного специалиста из приведенного выше описания и прилагаемых чертежей, входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

#### Формула изобретения:

1. Способ восстановления органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, и при котором нарушения функции становятся обратимыми, указанный способ включает промывание органа при температуре приблизительно 28 - 37°C содержащим буфер физиологическим раствором для удаления крови и ацидотических продуктов, накопившихся в органе за период отсутствия кровотока; и перфузию органа при температуре около 28 - 37°C содержащим буфер физиологическим раствором, который дополнительно включает средства для расширения кровеносных сосудов в органе, трофические факторы с целью восстановления клеточной целостности и клеточной функции, восстанавливающие таким образом функцию органа, и средства для восстановления окислительного метаболизма в органе при реадaptации органа к оксигенированной среде.
2. Способ по п.1, при котором содержащий буфер физиологический раствор для перфузии органа дополнительно включает вазодилататоры и антиоксиданты в качестве средств для предотвращения повреждения тканей во время возобновления кровотока в органе.
3. Способ по п.1, при котором средства для восстановления окислительного метаболизма включают введение молекулярного кислорода посредством добавления оксигенатора или переносящего кислород агента.
4. Способ по п.1, при котором перфузию осуществляют с помощью устройства, включающего ламинарную или пульсирующую насосную систему для доставки содержащего буфер физиологического раствора; указанное устройство дополнительно включает средства для обеспечения и контроля перфузии и перфузионного давления, средства для контроля температуры и средства для обеспечения и контроля введения и выведения дыхательных газов, а также средства для тестирования или сбора для тестирования содержащего буфер физиологического раствора, который уже прошел через орган к монитору, и измерения одной или более функциональных характеристик, таких, как pH, различные виды давления, скорость тока жидкости, сосудистое сопротивление, различные химические составляющие, оксигенация, концентрация диоксида углерода и потребление кислорода.
5. Способ по п.4, при котором перфузию осуществляют с помощью второго устройства, соединенного с первым устройством, для тестирования или сбора для тестирования продукта, вырабатываемого органом, причем последующее определение параметров продукта, вырабатываемого органом,



соотносится с целостностью и функцией органа.

6. Способ восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушения функции органа становятся обратимыми, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает: (а) промывание органа содержащим буфер физиологическим раствором, который удаляет кровь и кислотные продукты, накопившиеся в органе за период отсутствия кровотока, и дополнительно включает средства для восстановления физиологического pH органа, средства для расширения микрососудов в органе, средства для поддержания продолжающегося анаэробного метаболизма, метаболические субстраты для восполнения пула адениновых соединений, поддержания цикла лимонной кислоты и восстановления системы транспорта электронных пар для инициирования перехода от анаэробного метаболизма к окислительному метаболизму, трофические факторы для восстановления функции органа, обеспечивая таким образом метаболиты для восстановления клеточной целостности и клеточной функции; и (b) перфузию органа содержащим буфер физиологическим раствором, который дополнительно включает средства для нормализации снабжения органа кислородом и pH органа, средства для расширения кровеносных сосудов в органе и трофические факторы для восстановления функции органа, обеспечивая таким образом метаболиты для восстановления клеточной целостности и клеточной функции.

7. Способ по п.6, при котором содержащий буфер физиологический раствор для перфузии органа дополнительно включает вазодилататоры и антиоксиданты в качестве средств для предотвращения повреждения тканей во время возобновления кровотока в органе.

8. Способ по п.6, при котором средства для восстановления окислительного метаболизма включают введение молекулярного кислорода посредством добавления оксигенатора или переносящего кислород агента.

9. Способ по п.6, при котором перфузию осуществляют с помощью устройства, включающего ламинарную или пульсирующую насосную систему для доставки содержащего буфер физиологического раствора; указанное устройство дополнительно включает средства для обеспечения и контроля перфузии и перфузионного давления, средства для контроля температуры и средства для обеспечения и контроля введения и выведения дыхательных газов, а также средства для тестирования или сбора для тестирования содержащего буфер физиологического раствора, который уже прошел через орган к монитору, и измерения одной или более функциональных характеристик, таких, как pH, различные виды давления, скорость тока жидкости, сосудистое сопротивление, различные химические составляющие, оксигенация, концентрация диоксида углерода и потребление кислорода.

10. Способ по п.9, при котором перфузию осуществляют с помощью второго устройства, соединенного с первым устройством, для тестирования или сбора для тестирования продукта, вырабатываемого органом, причем последующее определение параметров продукта, вырабатываемого органом, соотносится с целостностью и функцией органа.

11. Восстановительный раствор для восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушения функции органа становятся обратимыми в органе, лишенном кровотока, указанный восстановительный раствор включает содержащий буфер физиологический раствор и дополнительно включает вазодилататоры в физиологически эффективном количестве для расширения кровеносных сосудов органа, химические энергетические субстраты в физиологически эффективном количестве для восстановления окислительного метаболизма, прекратившегося в период отсутствия кровотока в органе, и трофические факторы в физиологически эффективном количестве для ускорения одного или более восстановительных процессов в клетках с целью восстановления клеточной функции, утраченной в период отсутствия кровотока.

12. Восстановительный раствор по п.11, в котором вазодилататоры включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из субстратов для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, субстратов для расширения микрососудов, блокаторов кальциевых каналов.

13. Восстановительный раствор по п.12, в котором субстраты для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, включают ацетилхолин и аргинин, субстраты для расширения микрососудов включают простагландин и  $Mg^{+}$ , а блокаторы кальциевых каналов включают аденозин и верапамил.

14. Восстановительный раствор по п.11, в котором химические энергетические субстраты включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из компонентов пула адениновых соединений, компонентов цикла лимонной кислоты и компонентов цепочки транспорта электронных пар.

15. Восстановительный раствор по п.14, в котором химические энергетические субстраты выбирают из группы, состоящей из пирувата, глюкозы, АТФ, АМФ, кофермента

А,  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>), флавинадениндинуклеотида (ФАД), тиаминпирофосфат хлорида (кокарбоксилазы), УТФ, хлорида, магния и их комбинаций.

16. Восстановительный раствор по п.11, в котором трофические факторы выбирают из группы, состоящей из аминокислот, магния, производных нуклеиновых кислот, рибонуклеозидов, кислого фактора роста фибробластов (ФРФ), основного ФРФ, гепарина и хондроитинсульфата и их комбинаций.

17. Восстановительный раствор по п.11,

который дополнительно включает физиологически эффективное количество компонента, выбранного из группы, состоящей из антиоксиданта, переносящего кислород агента и их комбинаций.

18. Восстановительный раствор по п.11, который дополнительно включает фармакологически эффективное количество нейропротекторного лекарственного средства.

19. Способ восстановления органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание органа и перфузию органа восстановительным раствором по п.11.

20. Способ восстановления органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание и перфузию органа восстановительным раствором по п.17.

21. Способ восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание и перфузию органа восстановительным раствором по п.11.

22. Способ восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание и перфузию органа восстановительным раствором по п.17.

23. Способ приготовления раствора для восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, включающий добавление к содержащему буфер физиологическому раствору комбинации добавочных веществ, включающих вазодилаторы в физиологически эффективном количестве для расширения кровеносных сосудов органа; химические энергетические субстраты в

физиологически эффективном количестве для восстановления окислительного метаболизма, прекратившегося в период отсутствия кровотока в органе, и трофические факторы в физиологически эффективном количестве для ускорения одного или более восстановительных процессов в клетках с целью восстановления клеточной функции, утраченной в период отсутствия кровотока, где pH указанного раствора доводят до значений в пределах около 6,5 - 7,5, а его осмолярность превышает 330 мОсм.

24. Способ по п.23, при котором вазодилаторы включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из субстратов для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, субстратов для расширения микрососудов, блокаторов кальциевых каналов и их комбинаций.

25. Способ по п.24, при котором субстраты для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, включают ацетилхолин и аргинин, субстраты для расширения микрососудов включают простаглицлин и  $Mg^{+}$ , а блокаторы кальциевых каналов включают аденозин и верапамил.

26. Способ по п. 23, при котором химические энергетические субстраты включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из компонентов пула адениновых соединений, компонентов цикла лимонной кислоты и компонентов цепочки транспорта электронных пар.

27. Способ по п.26, при котором химические энергетические субстраты выбирают из группы, состоящей из пирувата, глюкозы, АТФ, АМФ, кофермента А,  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотида ( $НАД^{+}$ ),  $\beta$ -никотинамидаденинтринуклеотида ( $НАДН$ ), флавинадениндинуклеотида (ФАД), тиаминпирофосфат хлорида (кокарбоксилазы), УТФ, хлорида, магния и их комбинаций.

28. Способ по п.23, при котором трофические факторы выбирают из группы, состоящей из аминокислот, магния, производных нуклеиновых кислот, рибонуклеозидов, кислого фактора роста фибробластов (ФРФ), основного ФРФ, гепарина и хондроитинсульфата и их комбинаций.

29. Способ по п.23, при котором добавочные вещества дополнительно включают физиологически эффективное количество компонента, выбранного из группы, состоящей из антиоксиданта, переносящего кислород агента и их комбинаций.

30. Способ по п.23, при котором добавочные вещества дополнительно включают фармакологически эффективное количество нейропротекторного лекарственного средства.

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2



Таблица 1

Дополнительные вещества, добавляемые к основному раствору  
(количества в миллиграммах на литр основного раствора)

Вазодилататоры	Количество
аргинин	140
ацетилхолин	2
верапамил	0,2
простациклин	0,06
магний	600
Химические энергетические субстраты	
АТФ	2
АМФ	2
УТФ	4
Кофермент А	10
дифосфопиридиннуклеотид	28
ФАД	4
трифосфопиридиннуклеотид натрий	4
кокарбоксилаза	4
Трофические факторы	
кислый и/или основной ФРФ	200
пируват	220
глюкоза	2 000
гепарин	180
инсулин	10
(Производные нуклеиновых кислот)	
дезоксиаденозин	40
дезоксигуанозин	40
дезоксцитидин	40
тимидин	40
(Рибонуклеотиды)	
аденозин	40
цитидин	40
гуанозин	40
уридин	40

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

Таблица 2

Параметры	Нормальные	Ишемические
количество почек	25	5
среднее давление	50/30	44/40
средняя скорость тока жидкости	>95 см <sup>3</sup> /мин	12,9 см <sup>3</sup> /мин
среднее сосудистое сопро- тивление	0,4	3,26
выработка мочи	есть	нет

Таблица 3

Параметры	30 минут ишемии	60 минут ишемии
		+ р-р изобре- тения
количество почек	5	16
среднее давление	44/40	54/25
средняя скорость тока жидкости	12,9 см <sup>3</sup> /мин	97,4 см <sup>3</sup> /мин
среднее сосудистое сопро- тивление	3,26	0,47
выработка мочи	нет	есть

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

Таблица 4

Параметры	60' (N=16)	90' (N=5)	120' (N=5)	240' (N=2)
давление (мм рт.ст.)	54/25	58/37	55/37	52/40
скорость тока жидко- сти (см <sup>3</sup> /мин)	97,4	72	68,6	36,5
сосудистое сопро- тивление	0,47	0,67	0,73	1,27
креатинин (мг/дл)	41,8	22,9	18,5	23,5
гистология	хорошо сохранив- шиеся	хорошо сохранив- шиеся, с точечными очагами уплощен- ного эпителия	в целом хорошо; с то- чечными очагами отеков	точеч- ный ранний некроз

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2



Таблица 5

Параметры	Восстановительный раствор	RSM-210™	VIASPAN™
давление (мм рт.ст.)	54/25	44/40	54/46
скорость тока жидкости (см³/мин)	97,4	12,9	27
сосудистое сопро- тивление	0,47	3,25	1,8
креатинин (мг/дл)	41,8	нет мочи	нет мочи
гистология	хорошо сохранив- шиеся	хорошо сохранив- шиеся	набухание клубоч- ков, ран- ний тубу- лярный некроз

RU 2199310 C2

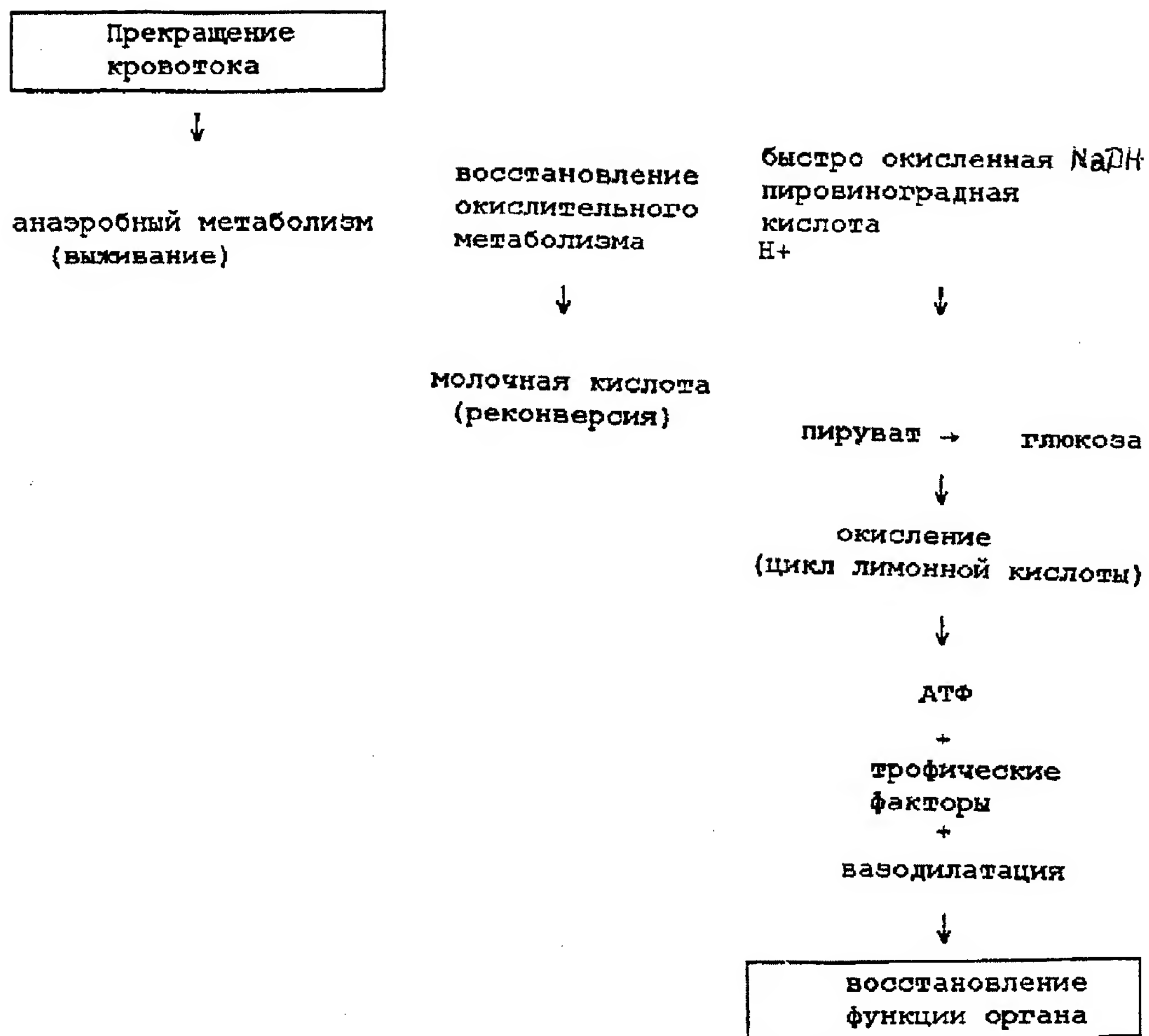
RU 2199310 C2

Таблица 6

Раствор	давление (мм рт. Ст.)	скорость тока жид- кости (см <sup>3</sup> /мин)	сосудис- тое соп- ротивле- ние	креати- нин	гистоло- гия
ВР	54/38	92,3	0,50	8,4	хорошо сохрани- вшиеся
ВР-ЭР	56/36	98,2	0,58	8,3	хорошо сохра- нившиеся
ВР-Гем	58/42	66,67	0,75	18	хорошо сохрани- вшиеся
ВР-ПФХ	54/25	97,4	0,47	41,8	хорошо сохрани- вшиеся

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2



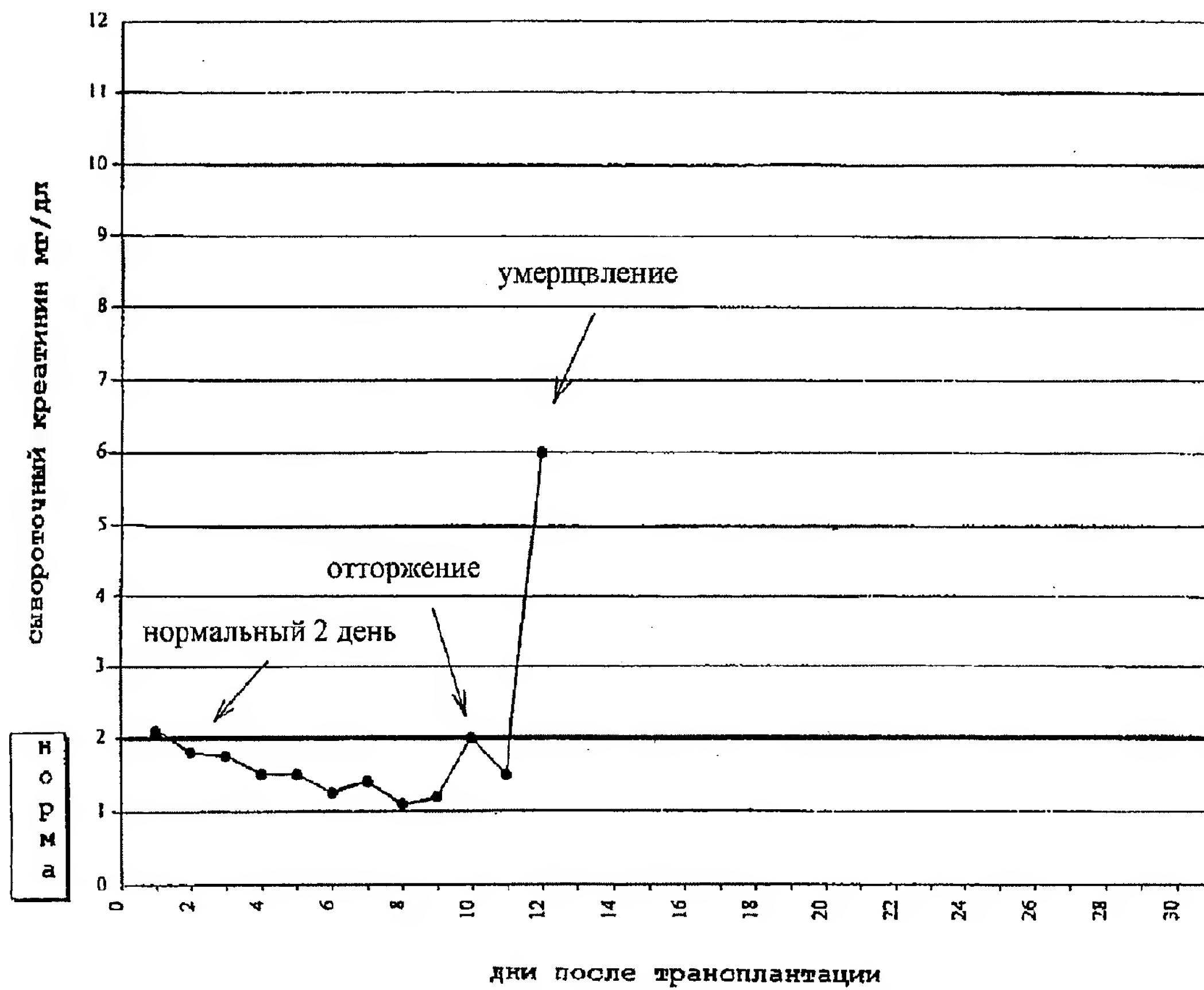
Фиг.1

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2



аллотрансплантация после  
60-минутной тепловой ишемии

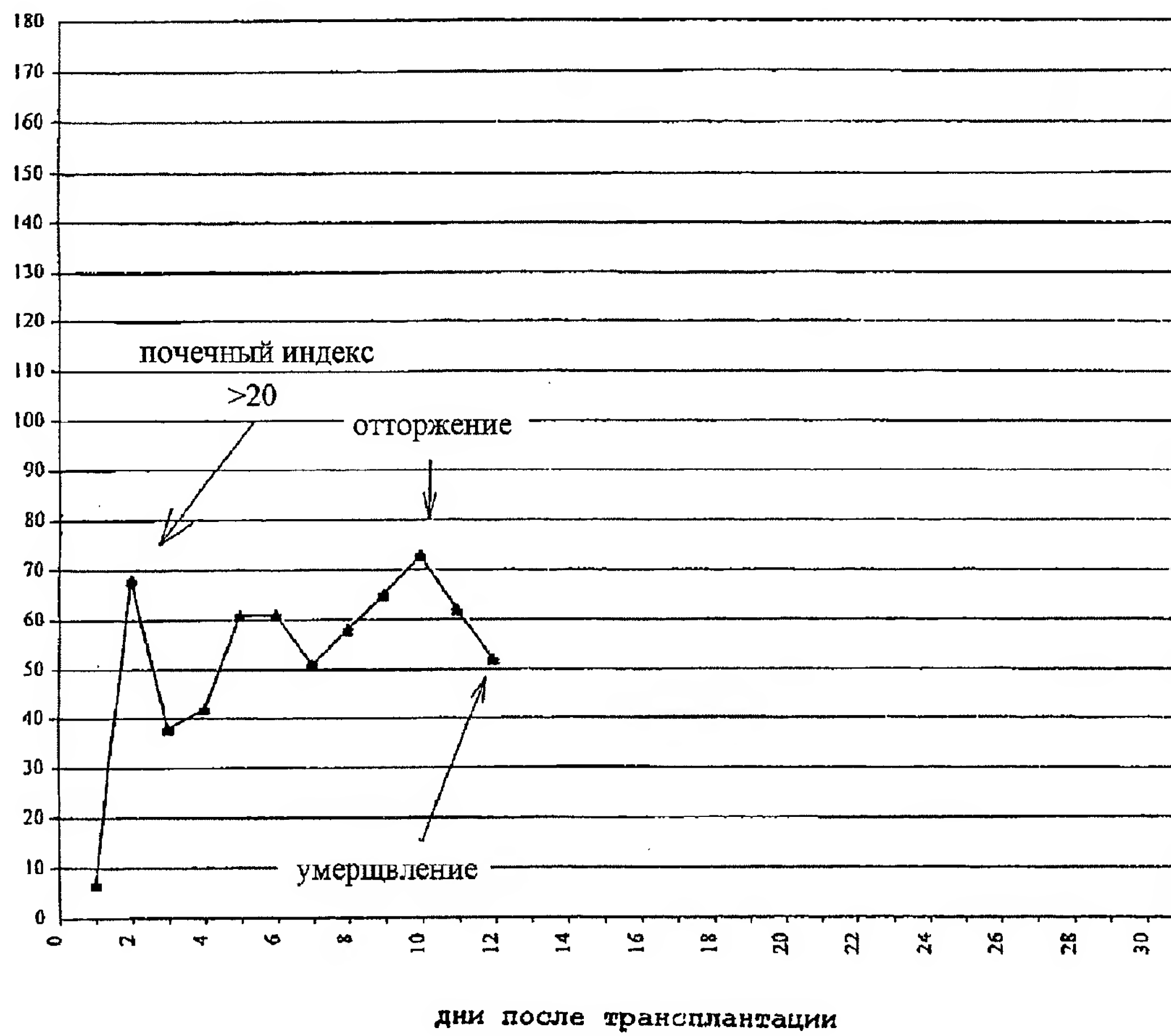


Фиг.2

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

# аллотрансплантация после 60-минутной тепловой ишемии

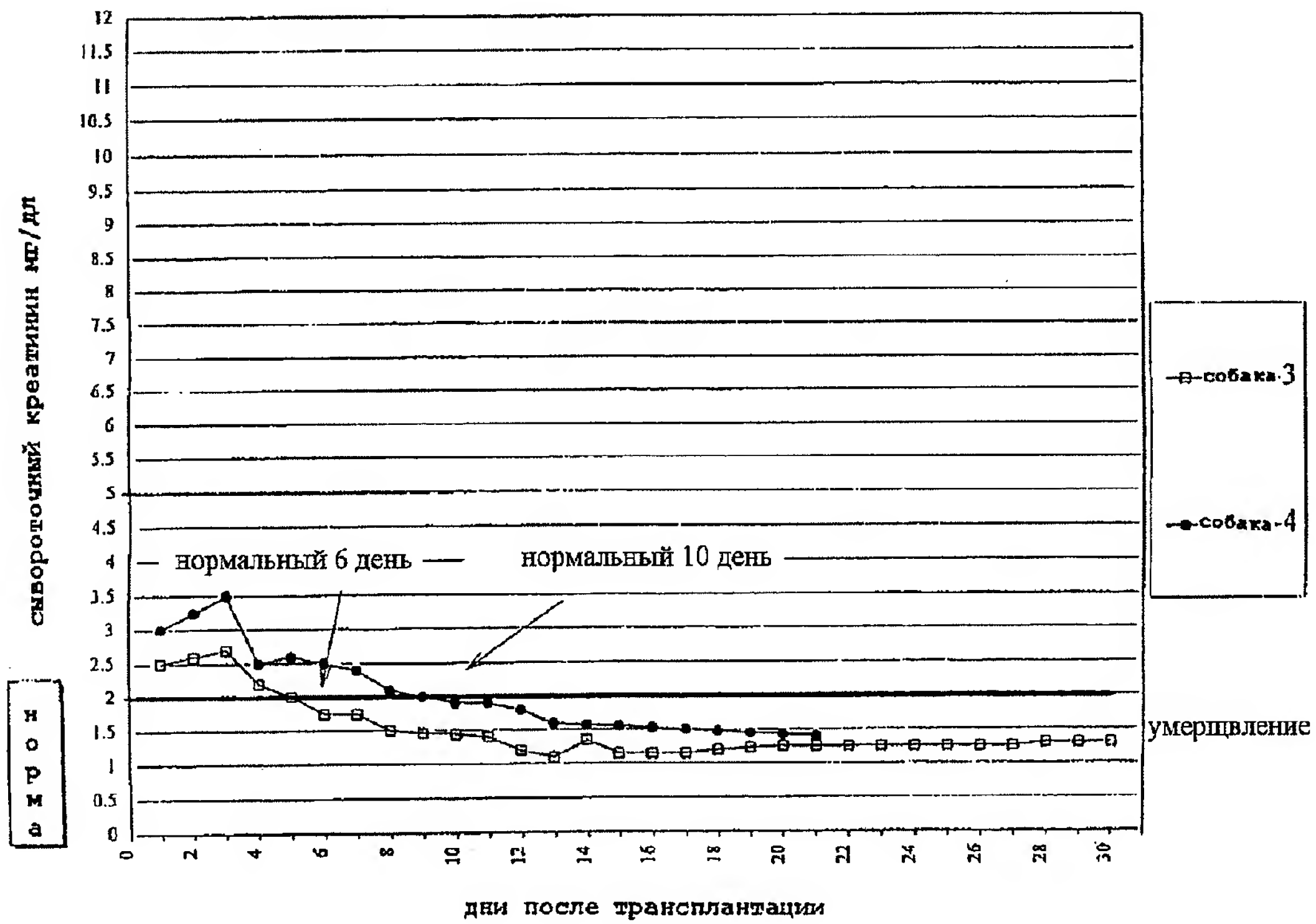


Фиг.3

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

ауто трансплантация после  
2 часов тепловой ишемии



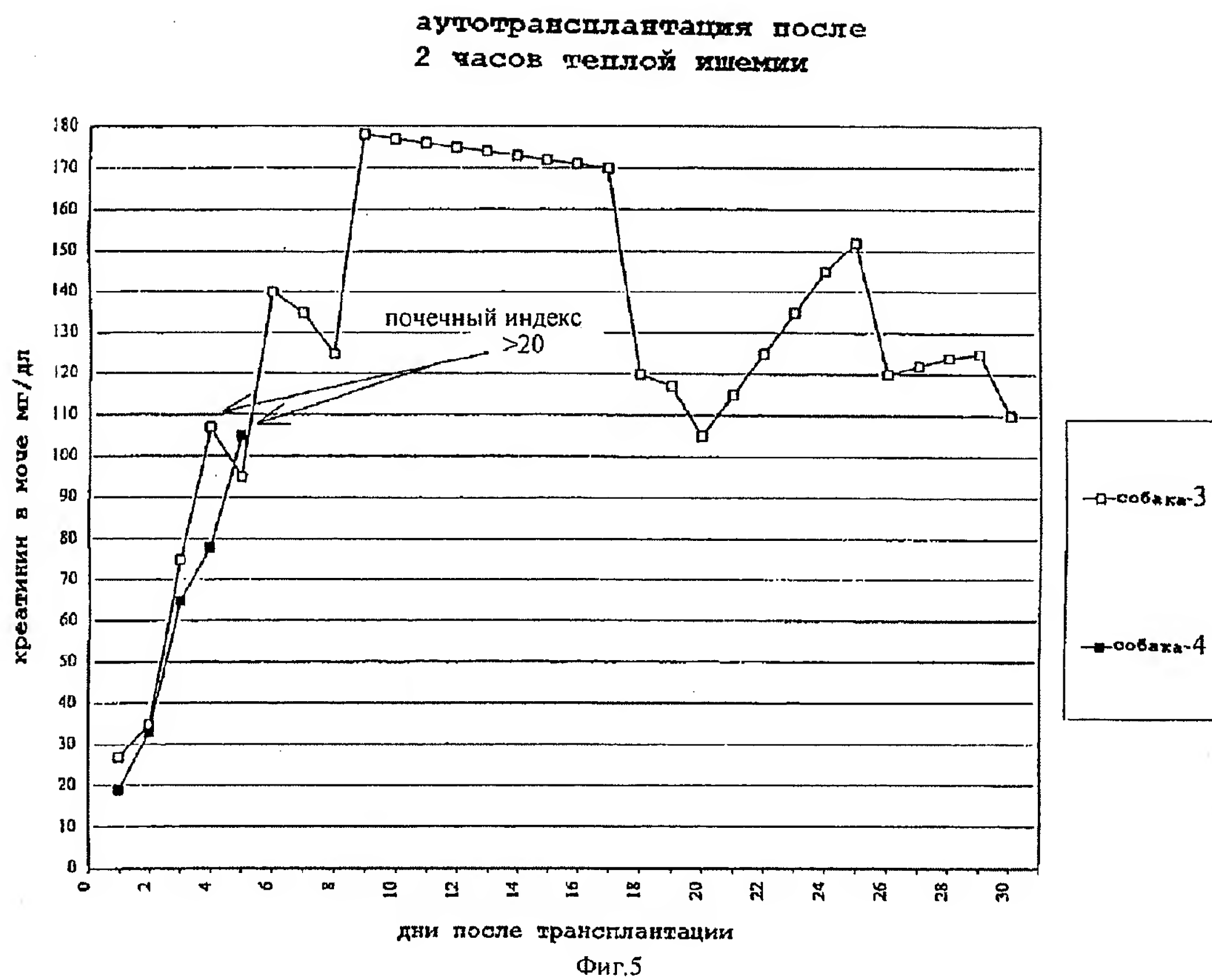
Фиг.4

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2



RU 2199310 C2



RU 2199310 C2